KORRELATION VON STRAHLENSENSIBILITÄT UND NITROFURANTOIN-EMPFINDLICHKEIT BEI ESCHERICHIA COLI K-12

KONRAD KLÖCK

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0014

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

KORRELATION VON STRAHLENSENSIBILITÄT UND NITROFURANTOIN-EMPFINDLICHKEIT BEI ESCHERICHIA COLI K-12

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Konrad Klöck

aus

Marktoberdorf

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der

Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. K. R. T r o t t
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. L i s s n e r
Dekan:	Prof. Dr. W. S p a n n
Tag der mündlichen Prüfung:	1o.3.1981

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Das Nitrofurantoin (NF) und seine Wirkung	1
1.2 Reparaturmechanismen der Zelle bei Strahlenschäden	1
1.3 Nitrofurantoin und Strahlensensibilität	4
2. Material und Methoden	4
2.1 Bakterienstämme	4
2.2 Chemikalien	5
2.3 Medien und Lösungen	6
2.4 Methoden	9
2.4.1 Bestimmung der Strahlensensibilität verschiedener E. coli Stämme	9
a) Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen	9
b) Sensibilität gegenüber UV 254 nm-Strahlung	1o
2.4.2 Gradientenplatten	1o
2.4.3 Einzelplattenversuch	12
2.4.4 Zeitabhängigkeit der NF-Wirkung auf das Wachstum verschiedener E. coli Stämme	14
2.4.5 Die Induktion von Mutationen in E. coli	15
2.4.6 Isolierung NF-sensibler Mutanten	16
2.4.7 Strahlen-Sensibilitätstest der NF-sensiblen Mutanten	17

Seite

3. Ergebnisse 19

3.1 Strahlen-Sensibilitätsuntersuchung von *E. coli* Stämmen 19

3.2 Gradientenplattenversuch 22

3.3 Einzelplattenversuch 23

3.4 Vergleich der Strahlen- und der NF-Sensibilität 25

3.5 Zeitabhängigkeit der NF-Wirkung auf strahlensensible *E. coli* Mutanten 26

3.6 Strahlensensibilität der isolierten NF-sensiblen Mutanten von AB 1157 28

4. Diskussion 34

4.1 Kreuzresistenz-Betrachtung bei *E. coli* 34

4.2 Vergleich der Strahlensensibilität mit der NF-Empfindlichkeit 35

4.3 Einfluß der Zeit auf die NF-Wirkung 37

4.4 Prüfen der NF-sensiblen Mutanten auf Strahlensensibilität 37

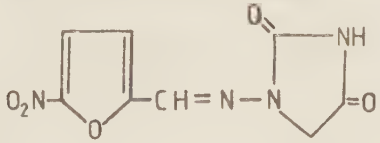
Zusammenfassung 39

Literaturverzeichnis 4o

1. Einleitung

1.1 Das Nitrofurantoin und seine Wirkung

Nitrofurantoin ist ein synthetisches Antibiotikum aus der Gruppe der Nitrofurane mit der Formel:



N-(5-Nitro-2-furfuryliden)-1-aminohydantoin (NF)

Obwohl die Wirkung des Nitrofurantoins (NF) schon seit 1944 bekannt war (5) und es seit langem bei Harnwegsinfektionen als Mittel der Wahl eingesetzt wird, wurde der Wirkungsmechanismus erst kürzlich entdeckt. McCalla und Mitarbeiter fanden heraus, daß sich die Nitrofurane in Dosen höher als 1oo µg/ml an die Nukleinsäuren binden und Brüche der DNA verursachen (12, 14, 15). Untersuchungen von Herrlich und Schweiger ergaben, daß NF in Dosen kleiner als 25 µg/ml in einer spezifischen Weise die Boten-RNA-Synthese induzierbarer Enzyme wie z.B. der ß-Galaktosidase hemmt (6). Die ß-Galaktosidase wird in E. coli nur dann synthetisiert, wenn Laktose im Nährmedium vorhanden ist.

1.2 Reparaturmechanismen der Zelle bei Strahlenschäden

Die UV-Strahlung verursacht eine Reihe photochemischer Veränderungen in der Zelle, von denen die Pyrimidin-Dimere und Kreuzvernetzung innerhalb der DNA-Kette am häufigsten sind (1, 2, 23). Bei ungenügender oder fehlender Reparatur sind

diese Schäden für die Zelle mutagen oder letal.

Die Röntgenstrahlen verursachen unter anderem vor allem Brüche der DNA-Kette und schädigen auf diese Weise die Zelle.

Von den in der Literatur beschriebenen zellulären Reparaturmechanismen ist bekannt, daß sie konstitutiv vorhanden sind (3, 1o, 19, 21, 22). Dazu gehört die 195o von A. Kelner entdeckte Photoreaktivierung (1o). UV-inaktivierte Bakterien können danach durch nachfolgende Behandlung mit sichtbarem Licht reaktiviert werden. Ober den Wirkungsmechanismus ist bekannt, daß ein Enzym, die Photolyase, sich an die beschädigte DNA bindet und mit Hilfe von Licht der Wellenlänge 34o-5oo nm die durch die UV-Strahlung in der DNA erzeugten Thymindimere spaltet.

Die Zellen haben aber nicht nur diese eine Möglichkeit, Schäden der DNA zu beseitigen, denn neben der Photoreaktivierung wird auch noch die Excisionsreparatur wirksam. Erste Hinweise auf diesen Mechanismus erhielt R. Setlow durch Versuche, die er 1964 durchführte (22). Die Reparatur verläuft in mehreren Schritten, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind. Dabei werden die strahlengeschädigten Nukleotide zusammen mit etwa 1oo folgenden aus dem DNA-Strang getrennt. Anschließend synthetisiert eine Polymerase die so entstandene Lücke wieder zu, wobei sie den komplementären Strang als Matrize benutzt. Die für die Excisionsreparatur notwendigen Enzyme sind Produkte der Gene uvr A, uvr B und uvr C. Außerdem sind dazu noch Enzyme wie die Polymerasen und Ligasen notwendig.

Wenn die Excisionsreparatur wie bei uvr-Mutanten ausfällt und die Photoreaktivierung ausgeschaltet ist, so haben die Zellen noch weitere Möglichkeiten, Strahlenschäden zu überwinden. Hinweise dafür ergaben sich aus Versuchen mit uvr-Mutanten, die noch geringe Dosierungen von UV-Strahlung überleben konnten (19). Da in rekombinationsdefekten Mutanten (= rec-Mutanten) keine Erholung der Zellen von Strahlenschäden beobachtet wurde, muß bei gewissen Reaktivierungsvorgängen auch Rekombination beteiligt sein. Danach stoppt die Replikation am Strahlenschaden, z.B. einem Dimer und fährt ca. 1ooo Nukleotide später fort. Die eigentliche Reparatur findet nach der Replikation statt (= post replication repair). Sie erfolgt durch den rekombinativen Austausch intakter Nukleotidsequenzen zwischen je einem Eltern- und einem Tochterstrang.

Wenn die drei beschriebenen Reparaturwege ausgefallen sind, so hat E. coli eine weitere Möglichkeit, ihr Oberleben zu sichern. Während die beschriebenen Mechanismen relativ fehlerfrei arbeiten, ist die sogenannte SOS-Reparatur mit Fehlern behaftet und führt deshalb in erhöhtem Maße zu Mutationen in den überlebenden Bakterien. Die einzelnen Schritte der von M. Radman und E. Witkin beschriebenen SOS-Reparatur sind noch nicht völlig erforscht (17, 25). Es gibt darüber einige plausible Hypothesen. Fest steht, daß dazu Produkte der Gene lex A und rec A benötigt werden und zwar werden sie vermutlich erst nach Bestrahlung induziert. Das bessere Oberleben von UV-bestrahlten Phagen auf ebenfalls bestrahlten Bakterien als Wirt weist auf eine induzierbare Reparatur hin (4, 24). Inzwischen gibt es biochemische Befunde für ein strahleninduziertes Protein (8, 19, 2o).

1.3 Nitrofurantoin und Strahlensensibilität

Da NF bei niedrigen Dosen die Bildung induzierbarer Proteine hemmt, müßte es, wenn es bei bestrahlten Zellen eine induzierbare Reparatur gibt, strahlensensibilisierend wirken. Wirkt aber NF selbst schädigend auf die DNA, sollten strahlensensible E. coli Mutanten NF-sensibler als der Wildtyp sein. Deshalb wurden in dieser Arbeit uvr-Mutanten, bei denen die Excisionsreparatur ausfällt und rec-Mutanten, bei denen keine Postreplikations- und SOS-Reparatur stattfindet, auf Strahlen- und NF-Sensibilität getestet. Es sollte die NF-Konzentration bestimmt werden, bei der eine Hemmung des unbestrahlten Wildtyps und der Mutanten festzustellen ist. Es sollte auch untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen Strahlen- und NF-Sensibilität besteht. Aufgrund einer erhöhten Sensibilität bestimmter Mutanten gegenüber NF könnte vielleicht auf den betroffenen Reparaturweg geschlossen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

In den Versuchsreihen wurden der Wildtyp und dessen strahlensensible Mutanten von E. coli K 12 verwendet.

AB 1157	Wildtyp
AB 1886	uvr A
AB 2499	uvr B
AB 247o	rec B
AB 2463	rec A
JG 138	pol A

Alle Stämme sind polyauxotroph und F⁻.
Die Nitrofurantoin-sensiblen Mutanten von E. coli AB 1157 isolierte ich nach den später beschriebenen Methoden.

2.2 Chemikalien

Das Nitrofurantoin N-(5-Nitro-2-furfuryliden-1-amino-hydantoin), abgekürzt NF, und das Nitrosoguanidin (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin) lieferte die Firma Sigma Chemical Company, St. Louis. Den Agar Noble, Bacto Tryptone und Bacto Yeast Extract bezogen wir von Difco Laboratories, Detroit. Die anderen Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

2.3 Medien und Lösungen

Für die Versuche wurden folgende Medien verwendet:

supplementiertes Davis Minimal Medium (SDM)

a)	7,o g	K_2HPO_4
	2,o g	KH_2PO_4
	o,5 g	Na_3 Citrat x 2 H_2O
	1,o g	$(NH_4)_2SO_4$
b)	4,o g	Glucose
c)	o,2 g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
d)	1 mg	Vit B_1
e)	o,2o96 g	L-Histidin
f)	Aminosäure - Mix:	
	o,1191 g	L-Threonin
	o,1312 g	L-Leucin
	o,1151 g	L-Prolin
	o,1742 g	L-Arginin

Alle Gewichtsangaben beziehen sich auf 1ooo ml Aqua dest. Die Lösungen a bis f müssen getrennt autoklaviert und werden erst dann gemischt, um chemische Reaktionen beim Autoklavieren zu vermeiden.

supplementierter Davis Minimal Agar

a)	7,o	g	K_2HPO_4
	2,o	g	KH_2PO_4
	o,5	g	$Na_3Citrat \times 2\ H_2O$
	1,o	g	$(NH_4)_2SO_4$
b)	4,o	g	Glucose
c)	o,2	g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
d)	1	mg	Vitamin B_1
e)	o,2o96	g	L-Histidin
f)	Aminosäure - Mix:		
	o,1191	g	L-Threonin
	o,1312	g	L-Leucin
	o,1151	g	L-Prolin
	o,1742	g	L-Arginin
g)	12,o	g	Agar Noble

Der nach dem Autoklavieren gemischte Davis Minimal Agar wurde bis zum Versuch in einem 48^{o} C warmen Wasserbad flüssig gehalten.

Phosphatpuffer

3,5 g KH_2PO_4 und 5,8 g Na_2HPO_4

oder 7,2 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$

oder 1o,9 g $Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$

pro 1ooo ml

Mit 1 N Natronlauge wurde der pH Wert 7,o eingestellt.

Citratpuffer

29,41 g Na_3 Citrat x 2 H_2O pro 1ooo ml

Der pH Wert wird mit Zitronensäure auf 5,5 eingestellt.

Luria Broth Medium (LB)

1o,o g Bacto Tryptone

5,o g Bacto Yeast Extract

1o,o g NaCl

pro 1ooo ml Aqua destillata

Luria Broth Agar

1o,o g Bacto Tryptone

5,o g Bacto Yeast Extract

1o,o g NaCl

12,o g Agar Noble

pro 1ooo ml Aqua destillata

2.4 Methoden

2.4.1 Bestimmung der Strahlensensibilität verschiedener Escherichia coli Stämme

a) Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen.

Eine Kultur wird angelegt und bis zum Erreichen der log-Phase im Schüttelwasserbad bebrütet. Dann werden 5 ml der Bakteriensuspension in eine Bestrahlungsküvette pipettiert und 5 bis 1o Minuten mit Sauerstoff begast. Die Röntgenbestrahlung erfolgte unter O_2 Begasung, bei 5o kV, 25 mA im Fokus-Objekt-Abstand 75 mm ohne externe Filter, mit einer Dermopan Röntgenanlage (Siemens). Im Fokus-Objekt-Abstand von 75 mm wurde die Dosisleistung durch Fricke-Dosimetrie mit 85 Gray/Minute bestimmt.

Aus der verdünnten Bakteriensuspension wird die entsprechende Menge in Petrischalen pipettiert und mit Luria Broth Agar ausgeplattet.

Nach Bebrüten der Platten im Brutschrank bei 37^{o} C konnten die überlebenden Kolonien ausgezählt und das Verhältnis zu den Kontrollplatten ausgerechnet werden. Die Ergebnisse wurden als Oberlebenskurven dargestellt.

b) Sensibilität gegenüber UV 254 nm-Strahlung

5 ml einer log-Kultur werden durch einen Membranfilter der Porengröße o,45 µm gefiltert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Den Filter legt man mit einer sterilen Pinzette in einen Erlenmeyerkolben und spült ihn mit 5 ml Phosphatpuffer ab. Nach 3o Minuten wird die Bakteriensuspension in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 7,5 cm geschüttet und, nachdem die Null-Probe entnommen wurde, unter ständigem magnetischen Rühren mit einer UV-Lampe (Quecksilberniederdrucklampe HNS 1o W Osram) bestrahlt. Nach verschiedenen Bestrahlungszeiten werden o,1 ml herauspipettiert, verdünnt und mit Luria Broth Agar ausgeplattet. Der Strahlenfluß der UV-Strahlen wurde mittels eines Germicidal Photometers IL 254 und einer Vakuum-Photodiode (Photosensor PT 1oo von International Light Inc.,USA) gemessen. Er betrug 1 J/m^2 x sec. bzw. o,125 J/m^2 x sec. nach Filterung mit Maschendraht.

Nach 24 Stunden im Brutschrank waren die Kolonien so weit gewachsen, daß sie ausgezählt werden konnten. Die Ergebnisse wurden in Oberlebenskurven dargestellt.

2.4.2 Gradientenplatten

Für die Ermittlung der Mindestkonzentration von Antibiotika, die nötig ist, um Bakterien abzutöten oder an der Ver-

mehrung zu hindern, werden Tests mit Gradientenplatten gemacht.

Für die späteren Versuche ist es notwendig, eine grobe Einschätzung der Sensibilität der E. coli Stämme, die getestet werden sollen, vorzunehmen. Dafür eignet sich die Methode der Gradientenplatten gut. Dabei wird eine "Obernachtkultur" des betreffenden Stammes mit suppl. Davis Minimal Medium (SDM) angelegt und über Nacht bei 37^{o} C in Schüttelwasserbad bebrütet. Die Zellen wachsen dabei bis zu einer Konzentration von $1o^{9}$ Bakterien pro Milliliter (ml) heran. Die Dichte der Zellen ist dann so groß, daß ein weiteres Wachsen nicht mehr möglich ist. Den Zustand, in der sich eine solche Kultur befindet, nennt man deshalb auch stationäre Phase.

Für den Versuch werden 5oo ml SDM-Agar und 45o ml SDM-Agar, der nach dem Autoklavieren mit 5o ml einer Lösung von 1o mg / 1oo ml NF gemischt wird, hergestellt. Der NF-Agar hat also eine NF-Konzentration von 1o µg / ml.

Dann pipettiert man je 1o ml NF-Agar in Petrischalen und stellt sie so geneigt auf ein Lineal, daß der Agar den Boden am einen Ende der Schale gerade noch bedeckt.

Nach dem Festwerden des Agars werden die Schalen wieder eben auf die Tischplatte gestellt und weitere 1o ml Agar ohne NF dazugegeben.

Wir erhalten somit die Gradientenplatten, die, bei Vernachlässigung der Oberflächenspannung des Agars, einen linearen Konzentrationsanstieg von 0 bis 1o µg NF pro ml haben.

Abb. 1: Schematische Darstellung der Gradientenplatte

Mit einer Pipette werden o,1 ml stationäre Bakterienkultur auf die Gradientenplatte gebracht und mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Die Gradientenplatten kommen dann in den 37^{o} C warmen Brutschrank. Nach ca. 48 Stunden kann man dann ermitteln, ab welcher Konzentration der Bakterienwuchs gehemmt wird und kann so eine Einschätzung der Sensibilität der jeweiligen Stammes vornehmen.

2.4.3 Einzelplattenversuch

Der Einzelplattenversuch wird sowohl für die stationäre als auch für die exponentielle Wuchsphase durchgeführt. Für die exponentielle Wuchsphase legt man eine Kultur des Stammes an und bebrütet sie bei 37^{o} C im Schüttelwasserbad. Nach bestimmten Zeitabständen wird eine Probe entnommen, die man mit einer Neubauer Zählkammer bei 4oo-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop auszählt. Wenn die Bakterien durch Vermehrung einen Titer von ca. $2 \times 1o^{8}$ Zellen pro ml erreicht haben, werden sie als log-Kultur oder exponentielle Wuchsphase betrachtet. Dieser Zustand wird, je nach Stamm, nach ca. 3 - 4 Stunden erreicht, wenn die Obernachtkultur 1 : 1oo verdünnt wurde.

Für den Einzelplattenversuch werden sechs verschieden hohe Konzentrationen von NF-Agar hergestellt. Wegen der unterschiedlichen Sensibilität der Stämme (siehe Gradientenplattenversuch) sind für den Versuch folgende NF-Konzentrationen nötig:

AB 1157	0 /0 1 µg / 1,5 µg / 2 µg / 2,5 µg / 3 µg 3,5 µg / 4 µg / 4,5 µg pro ml Agar
AB 1886	0 /o,2 µg/o,3 µg/o,4 µg/o,5 µg/o,6 µg/ pro ml
AB 2499	0 /o,1 µg/o,2 µg/o,3 µg/o,4 µg/o,5 µg/o,6 µg/ml
AB 247o	0 /1,o µg/1,2 µg/1,4 µg/1,6 µg/1,8 µg/2,o µg/ml
AB 2463	0 /o,1 µg/o,15 µg/o,2 µg/o,22 µg/o,24 µg/o,26 µg/ml
JG 138	0 /o,5 µg/1,o µg/1,5 µg/2,o µg/2,5 µg/3,o µg/ml

Wie vorher beschrieben, wird eine Übernachtkultur des betreffenden E. coli Stammes angelegt. Mit Phosphat-Puffer wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und die stationäre Kulter um den Faktor $1o^{-6}$ verdünnt. Für Zellen in exponentieller Wuchsphase wird die Übernachtkultur 1 : 1oo in SDM verdünnt, im Schüttelwasserbad bebrütet, bis die Suspension eine Dichte von $2 \times 1o^{8}$ Zellen pro ml aufweist. Aus diesen Lösungen pipettiert man dann je o,1 ml, beziehungsweise o,o5 ml, in sterile Petrischalen. Darauf wird ca. 15 - 2o ml des jeweiligen NF-Agars gegossen und die Schale leicht geschwenkt, um die Bakteriensuspension im Agar gleichmäßig zu verteilen.

Nach dem Erstarren des Agars werden die Platten bei 37° C 48 Stunden lang bebrütet und dann die überlebenden Kolonien ausgezählt. Je NF-Konzentration wurden 5 Platten angefertigt und der Mittelwert der ausgezählten Kolonien berechnet. Sämtliche Versuche werden mindestens einmal wiederholt.

Je höher die NF-Konzentration ist, desto weniger Bakterien überleben. Bei dem Versuch wird die Grenzkonzentration des jeweiligen Bakterienstammes ermittelt, das heißt, die Konzentration, bei der kein Kolonienwuchs mehr stattfindet.

2.4.4 Zeitabhängigkeit der Nitrofurantoin-Wirkung auf das Wachstum verschiedener E. coli Stämme

Eine Kultur wird in 1o ml SDM bis zur exponentiellen Wuchsphase bebrütet. Jeweils 5 ml Bakteriensuspension werden durch Membranfilter (Porengröße o,45 µm) filtriert. Je einen Filter spült man mit 5 ml SDM und mit 5 ml NF-SDM in einen Erlenmeyerkolben. Folgende NF-suppl. Davis Minimal Medien wurden für die Versuche hergestellt:

E. coli Stamm	stat. Phase	expon. Wuchsphase
AB 1157	15 µg/ml	8 µg/ml
AB 1886	3 µg/ml	1,5 µg/ml
AB 247o	8 µg/ml	4 µg/ml
AB 2463	4 µg/ml	1 µg/ml

Beide Kolben werden bei 37 ^{o} C im Schüttelwasserbad bebrütet und nach bestimmten Zeitabständen (0, 3o Minuten, 6o Minuten, 9o Minuten, 12o Minuten) werden o,1 ml entnommen, in Phosphatpuffer um den Faktor $1o^{-5}$ verdünnt und o,1 ml pro Petrischale in SDM-Agar ausgeplattet. Je Zeiteinheit wurden 5 Platten hergestellt und der Mittelwert der ausgezählten Kolonien berechnet. Derselbe Versuch wurde auch mit stationärer Kultur durchgeführt.
Dieser Test wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mindestens einmal wiederholt. Bei den Ergebnissen wurde der Mittelwert aus diesen Versuchsergebnissen angegeben.

2.4.5 Die Induktion von Mutationen in Escherichia coli

Mutationen ereignen sich zufällig und spontan und betreffen nur einen kleinen Teil der Individuen in einer Population. Die Mutationsfrequenz kann durch chemische Stoffe, wie Nitrit oder alkylierende Substanzen erhöht werden; 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin ist ein sehr wirksames Mutagen.
Bei diesem Versuch sollen Mutationen beim E. coli Wildtyp AB 1157 mit Nitrosoguanidin induziert und NF-sensible Mutanten isoliert werden.
Dazu wird eine Übernachtkultur von E. coli AB 1157 1 : 1oo verdünnt und bis zur exponentiellen Wuchsphase bebrütet. 1o ml der Kultur werden bei 5ooo U/min zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1o ml Citratpuffer resuspendiert. Nach Wiederholung der

Zentrifugation werden die Zellen in 2 ml Citratpuffer resuspendiert und mit o,1 ml einer Nitrosoguanidinelösung der Konzentration 1 mg / ml versetzt. Man läßt die Nitrosoguanidinelösung 3o Minuten lang bei 37 ^{o} C auf die Zellen einwirken. Nach dem Bebrüten gibt man 8 ml Luria Broth Medium dazu und zentrifugiert nochmals 1o Minuten lang. Der Niederschlag wird in 1o ml Luria Broth Medium (LB) resuspendiert und wiederum bei 5ooo Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden in 1o ml LB resuspendiert und mit LB 1 : 5 verdünnt.

Nach Induktion einer Mutation manifestiert sich der Mutanten - Genotyp nicht sofort; einige Generationen von Wuchs sind notwendig, bevor die Mutation manifest wird. Deshalb wird die Suspension drei Stunden lang bei 37 ^{o} C im Schüttelwasserbad bebrütet. Danach wird die Lösung mit LB um den Faktor $1o^{-5}$ verdünnt, je o,1 ml auf LB-Agarplatten verteilt und bei 37 ^{o} C über Nacht bebrütet. Nach 24 Stunden waren die Kolonien der Bakterien gewachsen.

2.4.6 Isolierung NF-sensibler Mutanten

Da nach Einwirkung des Mutagens ein Gemisch verschiedenartiger Mutanten vorliegen, wir aber Mutanten mit erhöhter NF-Sensibilität gewinnen wollen, wurden NF-sensible Kolonien durch die Replika-Plating-Methode selektiert (Methode nach J. Lederberg und E.M. Lederberg, (11)).

Auf den bebrüteten Platten sollen sich gut isolierte Einzelkolonien bilden. Von den Petrischalen werden die 1o besten als Meisterplatten ausgesucht. Jede dieser Meisterplatten wird auf je ein Stück sterilen Samt gedrückt. Die Kolonien, die im Samt hängen bleiben, werden auf NF-Platten und Replika-Platten ohne NF übertragen, indem man diese Platten leicht auf den Samt drückt. In den NF-Platten ist LB-Agar mit einer NF-Konzentration von 5 µg/ml, während sich in den Replika-Platten nur LB-Agar befindet.

Nach dem Bebrüten ähnelt das Kolonienverteilungsmuster auf den NF-Platten dem der Replika-Platten. Kolonien NF-sensibler Mutanten fehlen jedoch auf den NF-Platten.

2.4.7 Strahlen-Sensibilitätstest der NF-sensiblen Mutanten

Die so isolierten Mutanten werden überprüft, ob sie tatsächlich NF-sensibler als der Wildtyp sind.

Dazu wird von jeder Mutante eine stationäre Kultur angelegt. Mit einer sterilen Platinöse wird die Kultur auf einer NF-Platte (5 µg/ml)zusammen mit einem Parallelstrich vom Wildtyp AB 1157 ausgestrichen. Die Wildtypzellen wachsen auf der NF-Platte noch, während die NF-sensiblen Mutanten im Wuchs gehemmt sind.

Die Mutanten, die sich als NF-sensibel erwiesen haben, werden einem Strahlen-Sensibilitätstest unterzogen. Wie beim letzten Versuch werden die stationäre Kultur sowohl des Wildtyps als auch der Mutanten auf LB-Agar Platten ausgestrichen, kurz bebrütet und Röntgen-bestrahlt.Dabei wird ein Teil der Petrischale mit einer Bleiplatte abgedeckt und ein Drittel der Schale 4 Minuten lang, (ca. 3oo Gray) ein weiteres Drittel 8 Minuten (ca. 6oo Gray) mit Röntgenstrahlen im Abstand 15 cm bestrahlt. Für diese quantitative Vergleichsuntersuchung wurde keine Dosismessung durchgeführt.

Für die Bestrahlung mit UV-Licht wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet. Ein Drittel der Platte wurde 3o Sekunden lang, das zweite Drittel 6o Sekunden lang bestrahlt und das letzte Drittel abgedeckt.

Anschließend wurden sämtliche NF-sensible Mutanten einer genauen Strahlen-Sensibilitätsmessung unterzogen, wie in 2.4.1 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Strahlen-Sensibilitätsuntersuchung von Escherichia coli Stämmen

Bevor die Nitrofurantoin-Sensibilität verschiedener strahlensensibler E. coli Mutanten bestimmt wurde, wurde die Strahlensensibilität der benutzten Mutanten überprüft.

In Abb. 2 sind die Überlebenskurven der E. coli Mutanten AB 1886 uvr A und AB 2470 rec B nach Röntgenbestrahlung, unter O_2-Begasung und in Abb. 3 nach UV-Bestrahlung dargestellt. Daraus geht hervor, daß die uvr A-Mutante UV-sensibler und die rec B-Mutante UV- und Röntgenstrahlen-sensibler als der E. coli Wildtyp ist. Wenn die NF-Sensibilität mit der UV-Sensibilität korreliert ist, sollten beide Mutanten uvr A und rec B NF-sensibler als der Wildtyp sein. Im Fall einer Korrelation mit Röntgenstrahlen-Sensibilität sollten sich nur rec B-Mutante und Wildtyp unterscheiden.

Die D_0 bzw. F_0 ist als diejenige Dosis definiert, die den Anteil der überlebenden Bakterien von 1,0 auf 0,37 im linearen Bereich der Dosis-Effekt-Kurve reduziert.

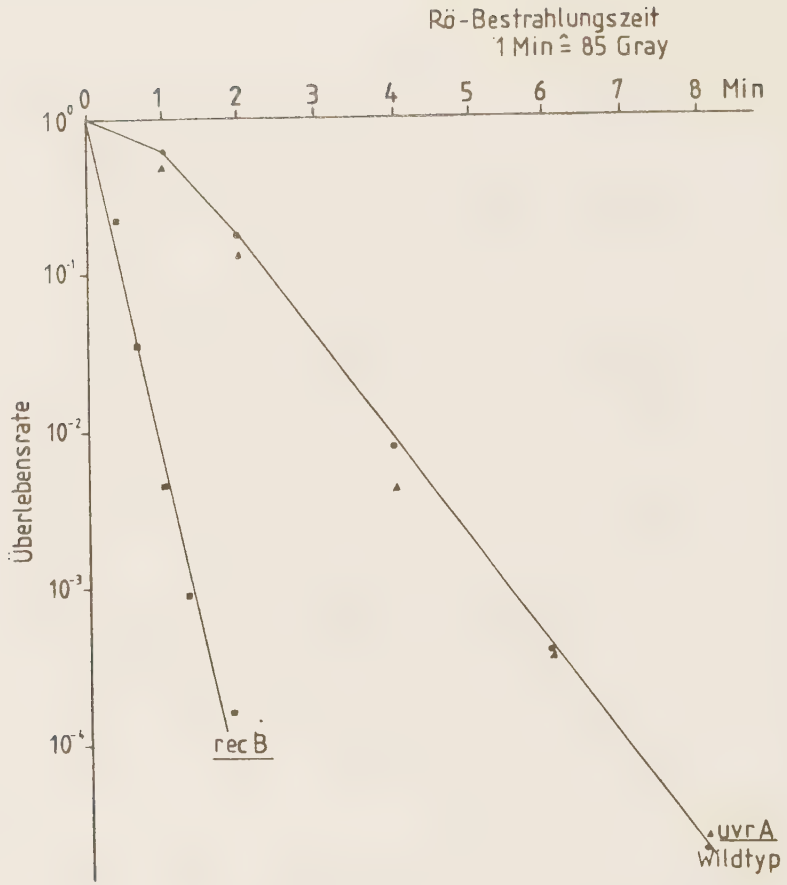


Abb. 2: Rö-Inaktivierung von E. coli AB 1157 (Wildtyp), AB 1886 (uvr A) und AB 247o (rec B) in exponentieller Wuchsphase.

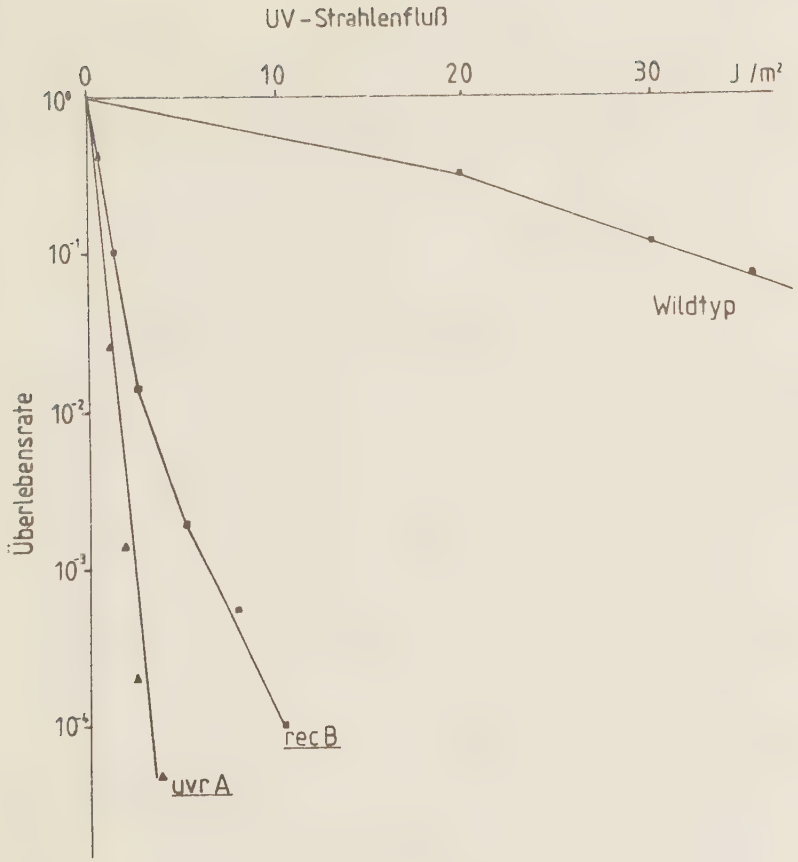


Abb. 3: UV 254 nm-Inaktivierung von E. coli AB 1157 (Wildtyp), AB 1886 (uvr A) und AB 247o (rec B) in exponentieller Wuchsphase.

3.2 Gradientenplattenversuch

Beim Gradientenplattenversuch wird eine grobe Einschätzung der NF-Sensibilität der E. coli Stämme vorgenommen. Da auf den Platten ein linearer Konzentrationsanstieg von 0 bis 1o µg/ml herrscht, kann man nach dem Bebrüten ermitteln, ab welcher Konzentration der Wuchs gehemmt wird.

Stamm	Mutation (betroffener Mechanismus)	NF-Grenzkonzentration (µg/ml)
AB 1157	Wildtyp	4,o ± o,9
AB 1886	uvr A Excision-Repair	2,5 ± o,3
AB 247o	rec B Rekombinations-Repair	2,5 ± o,6
AB 2463	rec A Rekombinations-Repair	1,9 ± o,1

Tab. 1: NF-Grenzkonzentrationen beim Gradientenplattenversuch

Bei jedem Versuch wurden acht Platten angefertigt und der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

Die rec A-Mutante war am NF-sensibelsten, uvr A und rec B gleich NF-sensibel. Die strahlensensiblen Mutanten verhalten sich damit gegenüber der Inaktivierung durch NF wie nach UV-Bestrahlung.

3.3 Einzelplattenversuch

Nachdem durch die Gradientenplatten-Methode die NF-Sensibilität grob bestimmt wurde, konnte eine genauere Hemmkonzentration im Einzelplattenversuch festgestellt werden. Dazu wurden Platten mit genau definierten NF-Konzentrationen angelegt und die einzelnen Mutanten darauf ausgeplattet. Für jede Konzentration wurden 5 Platten ausgegossen und der Mittelwert der ausgezählten Kolonien gebildet. Als NF-Grenzkonzentration wurde die Konzentration bezeichnet, bei der der Wuchs der Bakterien total gehemmt wurde.

Die Platten wurden vor dem Auswerten 48 Stunden lang bei 37 ^{o} C bebrütet. Für die Stämme AB 2499 uvr B und JG 138 pol A wurde nur die Kultur in exponentieller Wuchsphase getestet, da, wie aus den vorhergehenden Versuchen zu ersehen war, nur sehr geringe Unterschiede in der NF-Sensibilität zwischen exponentieller Wuchsphase und stationärer Phase bestehen.

Stamm	Mutation (betroffener Mechanismus	Wuchsphase	NF-Grenzkonzentration (µg/ml)
AB 1157	Wildtyp	expon.	4,2 ± o,3
		stat.	3,7 ± o,8
AB 1886	uvr A Excision-Repair	expon.	o,53 ± o,o6
		stat.	o,6o ± o,o6
AB 2499	uvr B Excision-Repair	expon.	o,5 ± o,o
AB 247o	rec B Rekombinations-Repair	expon.	1,7 ± o,1
		stat.	1,8 ± o,o
AB 2463	rec A Rekombinations-Repair	expon.	o,23 ± o,o1
		stat.	o,24 ± o,o2
JG 138	pol A DNA-Replikation Excision-Repair	expon.	2,2 ± o,3

Tab. 2: NF-Grenzkonzentration strahlensensibler E. coli Mutanten beim Einzelplattenversuch.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sämtliche Mutanten NF-sensibler als der Wildtyp sind.

3.4 Vergleich der Strahlen- und der Nitrofurantoin-Sensibilität

Ein Vergleich der Ergebnisse aus 3.1 und 3.3 zeigt, daß die NF-Sensibilität mit der UV-Sensibilität korreliert ist. Der E. coli Stamm AB 1886 weist eine sehr starke UV- und NF-Sensibilität auf, während er genauso Röntgenstrahlen-resistent wie der Wildtyp ist.

Stamm	NF-Grenzkonzentr. (µg/ml)	UV-Fluß F_o (J/m^2)	Rö-Dosis D_o (Gray)
AB 1157 Wildtyp	4,o	2o	6o
AB 1886 uvr A	o,5	1,o	6o
AB 247o rec B	1,8	1,5	15

Tab. 3: Vergleich der Strahlen- und der NF-Sensibilität

3.5 Zeitabhängigkeit der Nitrofurantoin-Wirkung auf strahlensensible Escherichia coli-Mutanten

Da die Wirkung eines chemischen Agens nicht nur von dessen Konzentration sondern auch von der Einwirkungsdauer abhängig ist, wurde in den folgenden Versuchen die Zeitabhängigkeit der NF-Wirkung auf das Überleben der verschiedenen strahlensensiblen Mutanten bestimmt. Zellen in stationärer oder exponentieller Wuchsphase wurden dazu in flüssigen SDM mit/ohne NF bei 37 ^{o} C bebrütet. Nach verschiedenen Zeiten der NF-Einwirkung wurden Proben genommen, das NF herausverdünnt und der Keimtiter der Bakterien bestimmt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Kolonienzahl in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer mit und ohne NF dargestellt.

Stamm		Zeitpunkt der Messung				
		o	3o Min.	6o Min.	9o Min.	12o Min.
AB 1157 stat. Phase	ohne NF	1o3	135	2o2	226	275
	15 µg/ml NF	1o6	115	132	151	225
expon. Phase	ohne NF	143	176	267	375	383
	8 µg/ml NF	129	1o6	81	134	126
AB 1886 stat. Phase	ohne NF	55	62	1o1	2o9	434
	3µg/ml NF	125	82	56	157	366
expon. Phase	ohne NF	147	169	214	336	381
	1,5µg/ml NF	159	1o4	118	194	149

Stamm		Zeitpunkt der Messung				
		o	3o Min.	6o Min.	9o Min.	12o Min.
AB 247o stat. Phase	ohne NF	155	13o	134	14o	2o7
	8 µg/ml NF	139	94	95	129	131
expon. Phase	ohne NF	67	8o	87	65	92
	4 µg/ml NF	44	59	58	33	35
AB 2463 stat. Phase	ohne NF	162	18o	175	222	314
	8 µg/ml NF	148	173	173	178	238
expon. Phase	ohne NF	72	1o6	116	123	193
	4 µg/ml NF	81	34	35	33	2o

Tab. 4: Zeitabhängigkeit der NF-Wirkung auf E. coli Mutanten. In der Tabelle ist der Mittelwert der Kolonien pro Petrischale angegeben.

Um eine sichtbare Wirkung zu erzielen, war es notwendig, für die stationäre Kultur höhere NF-Konzentrationen zu wählen. Kulturen in exponentieller Wuchsphase reagierten auf NF empfindlicher als die stationäre Kultur. Bei ausreichend hoher Dosierung von NF zeigte sich nach 3o Minuten ein Absinken der Anzahl der überlebenden Bakterien und nach ca. 9o Minuten erholten sie sich von der Wirkung des Antibiotikums. War die Dosierung des Nitrofurantoins etwas zu hoch, so ließ die Wirkung nicht nach.

3.6 Strahlensensibilität der isolierten Nitrofurantoin-sensiblen Mutanten von AB 1157

Die UV- und Röntgenstrahlen-Sensibilität der NF-sensiblen Mutanten (siehe Material und Methode zu ihrer Isolierung) wurde durch einen Schnelltest bestimmt. Dazu wurden jeweils die stationäre Kultur der isolierten Mutanten zusammen mit der Wildtypkultur auf einer LB-Platte ausgestrichen und bestrahlt. Ein Drittel der Platten wurde mit ca. 3oo Gray, ein weiteres Drittel mit ca. 6oo Gray und der letzte Teil der Platten überhaupt nicht bestrahlt. Die stationäre Kultur des jeweiligen Mutanten und des Wildtyps wurden auch auf einer NF-LB Platte ausgestrichen. Nach dem Bebrüten konnte man eine Einschätzung der Strahlen- und NF-Sensibilität aufgrund des Wuchses vornehmen.

+++ = Sensibilität wie Wildtyp
\+ = stärkste Sensibilität
+. = Sensibilität liegt zwischen + und ++

Mutanten Nr.	UV Sensibil.	Rö Sensibil.	NF-Sensibilität 6 µg/ml	5 µg/ml
1	+.	+.	+.	+
2	+.	+.	+	+.
3	+	+.	+.	++
4	+	+.	+	+.

Mutanten Nr.	UV Sensibil.	Rö Sensibil.	NF-Sensibilität 6 µg/ml	5 µg/ml
5	+.	+.	+	+
6	+	+	+	+
8	+.	+	+	+
9	+.	+.	++	+.
1o	+.	+	+.	+
11	+.	+		+
12	+	+		+
13	+.	+		+
14	+	+		++
15	++	+.	++	++
16	++	++	++	+
17	+.	++	++	+
18	++.	+.	++.	++
19	++	++		+.
2o	++	++.		++
21	++	++		+
22	+	+++		+
23	+	+++	+	+
24	+.	+++	+	+
25	+.	+++	+.	+.
26	+	+++	+	+.
27	++	+++	+	+
28	++	+++	++.	++
29	+++	+++	+.	++
31	+++	+++	++	++
32	+++	+++	++	++
33	+++	++.	+.	++
34	+++	+++	++	++

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Mutanten mit einer starken NF-Sensibilität auch eine starke UV-Sensibilität aufweisen. Ein Teil der Mutanten (Nr. 1 - 14) mit starker NF-Sensibilität zeigte auch eine ausgeprägte Röntgen- und UV-Sensibilität; dies läßt auf rec-Mutanten schließen. Ein anderer Teil (Nr. 22 - 26) war UV-sensibel und Röntgenstrahlen-resistent. Dabei handelt es sich vermutlich um uvr-Mutanten. Die Mehrzahl der isolierten NF-sensiblen Mutanten erwiesen sich bei diesem Test als UV-sensibel und zwar 26 von 32 , das entspricht 81 %. 62 % der NF-Mutanten waren Röntgen-sensibler. Die übrigen NF-sensiblen Mutanten waren genauso UV- und Röntgenstrahlen-resistent wie der Wildtyp von E. coli.

Die Mutanten Nr. 7 und Nr. 3o sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie bei späteren Tests nicht NF-sensibler als der Wildtyp waren.

Im folgenden wurden die NF-sensiblen Mutanten einer genaueren Untersuchung ihrer Strahlensensibilität unterzogen. Diese Oberprüfung konnte nicht mit allen ursprünglich vorhandenen Mutanten gemacht werden, da einige Stämme temperatursensibel waren und bei 37 ^{o} C nicht wuchsen. Andere Mutanten waren so sensibel, daß sie nach kurzzeitigem Aufbewahren im Kühlschrank nicht mehr anwuchsen.

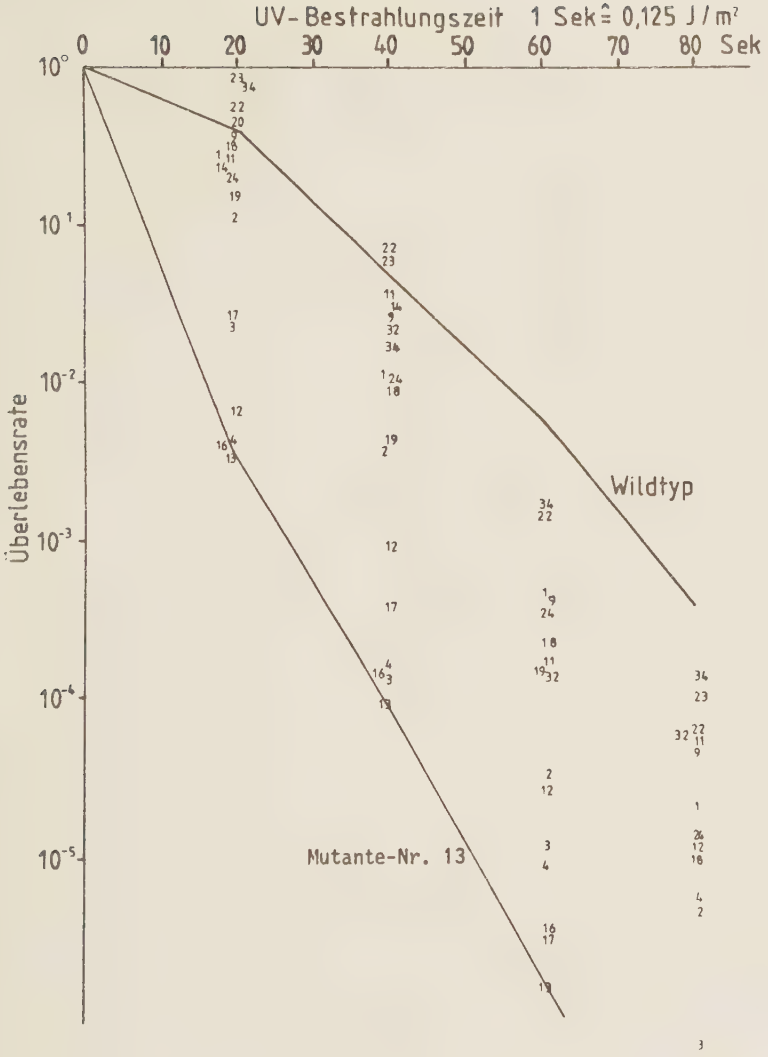


Abb. 4: UV 254 nm-Inaktivierung NF-sensibler Mutanten

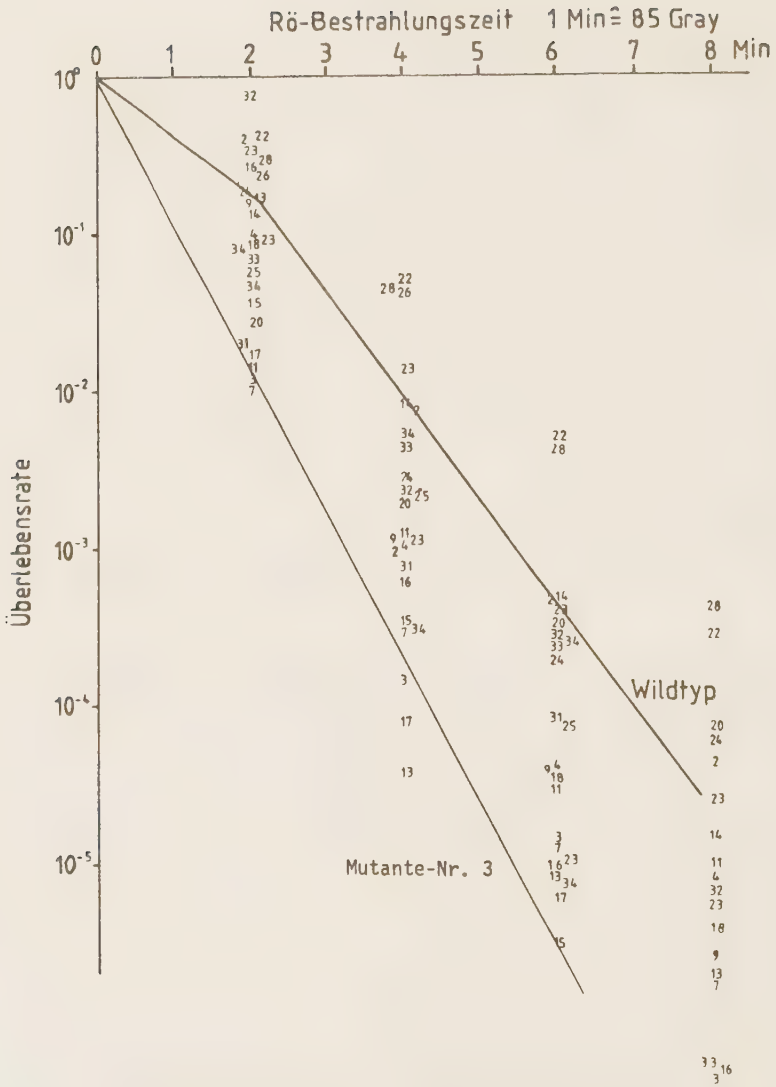


Abb. 5: Rö-Inaktivierung NF-sensibler Mutanten

Ergebnis der Oberlebenskurven

s = sensibel
s^s = extrem sensibel
r = resistent
r^r = extrem resistent

Mutanten Nr.	UV-Sensibilität	Rö-Sensibilität
1	temperatursensibel	
2	s	r
3	s	s
4	s	s
5	r	r
6	temperatursensibel	
8	s	s
9	s	s
1o	temperatursensibel	
11	s	s
12	s	s
13	s	s
14	s	r
15	s	s
16	s	s
17	s	s
18	s	s
2o	r^r	r
22	s	r^r
23	r	r
24	s	r
25	s^s	s
26	s^s	r^r
28	r^r	r^r
29	s	r

Mutanten Nr.	UV-Sensibilität	Rö-Sensibilität
31	s	s
32	r	r^r
33	s	s
34	r	r
38	s	s
39	s	s
42	s	s
44	r	r
45	r	r

Die Tabelle zeigt, daß 74 % der NF-sensiblen Mutanten UV-sensibel und 55 % Röntgenstrahlen-sensibel sind; alle Röntgen-sensiblen Mutanten sind auch UV-sensibel, keine Mutante ist nur Röntgenstrahlen-sensibel, sondern 19 % der Mutanten sind nur UV-sensibel.

4. DISKUSSION

4.1 Kreuzresistenz-Betrachtung bei E. coli

Kreuzresistenz-Untersuchungen bei E. coli S haben ergeben, daß Mutanten resistent gegen Nitrofurazon (ein Stoff aus der Gruppe der Nitrofurane), auch gegenüber UV-Licht und alkylierende Substanzen resistent waren (26). Deshalb sind die hier

durchgeführten vergleichenden Untersuchungen über Strahlensensibilität und NF-Empfindlichkeit von Interesse. Diese isolierten strahlenresistenten Mutanten von E. coli S waren im selben Ausmaß resistent gegenüber Nitrofurazon und UV-Strahlung, dagegen nicht resistent gegen 23 andere Antibiotika (26).

Hill und Simson stellten bei E. coli B/r fest, daß Mutanten, die resistenter gegenüber Strahlung sind, auch eine höhere Resistenz gegenüber Nitrofurazon aufweisen (7). Diese Ergebnisse wurden durch Versuche von McCalla bestätigt (13). Ein gemeinsamer biologischer Mechanismus ist wahrscheinlich die Ursache dieser Kreuzresistenz. Die DNA der Zelle ist Angriffspunkt für die letale Wirkung sowohl der UV- und der Röntgenstrahlung als auch von Nitrofurazon. Da aber die Wirkungsweisen des Nitrofurazon, der UV- und der Röntgenstrahlung unterschiedlich sind, liegt der gemeinsame Mechanismus der resistenten Mutanten vermutlich in der Fähigkeit, die in der DNA verursachten Schäden besser zu reparieren.

4.2 Vergleich der Strahlensensibilität mit der Nitrofurantoin-Empfindlichkeit

Alle untersuchten strahlensensiblen Mutanten waren auch NF-sensibler als der Wildtyp. Von NF ist bekannt, daß es Brüche der DNA verursacht (14, 15) und die induzierbare Synthese von Enzymen hemmt (6). Das Überleben der Zellen ist von der enzymatischen DNA-Reparatur abhängig, aber die dazu notwendige Synthese von Enzymen könnte durch das NF gehemmt werden.

McCalla fand, daß NF in geringeren Konzentrationen antibiotisch auf Bakterien wirkt als Nitrofurazon, obwohl Nitrofurazon wesentlich mehr DNA Brüche als NF verursacht (15). Die Ursache ist hier ebenfalls in einer Hemmung der Reparatur durch NF zu suchen. Herrlich und Schweiger stellten auch eine bakterizide Wirkung des Nitrofurantoins fest (6). Sie hat ihre Ursache in NF induzierten Schäden der DNA. Diese Schäden sind von der enzymatischen DNA Reparatur abhängig, aber dieser Reparaturmechanismus wird durch NF gehemmt.

Ein Vergleich der NF-Sensibilität mit den Inaktivierungskurven durch UV- und Röntgenstrahlen zeigt, daß eine Korrelation zwischen UV- und NF-Sensibilität besteht. Cytologische Analysen von Payne und Mitarbeiter weisen auch auf eine solche Korrelation hin. Sie konnten nach UV-Bestrahlung bei drei E. coli Stämmen eine Aggregation der DNA, Wachstum ohne Zellteilung und Filamentbildung erkennen (16). Die Behandlung der Stämme mit Nitrofurazon ergab ganz ähnliche Befunde.
Aus dieser Korrelation folgt eine wichtige Erkenntnis:
Mit dem NF wurde damit ein Stoff gefunden, der auf Zellen eine analoge Wirkung ausübt wie die UV-Strahlung, also UV-mimetisch wirkt. Unter den zahlreichen radiometischen Substanzen gibt es nur wenige UV-Mimetika, die bekanntesten sind 4-Nitrochinolin-1-oxyd (22) und das N-Acetoxy-2-acetylaminofluoren (18). Nitrofurantoin hat gegenüber diesen Stoffen den Vorteil, daß es schon lange Anwendung in der Therapie findet, da es seit mehr als 3o Jahren als Harnwegsantiseptikum eingesetzt wird, und weniger toxisch und mutagen als die anderen UV-Mimetika wirkt.

4.3 Einfluß der Zeit auf die Nitrofurantoin-Wirkung

Bei ausreichend hoher Dosis von NF zeigten die getesteten Stämme nach 3o Minuten ein Absinken der Anzahl der überlebenden Bakterien. Nach 9o - 12o Minuten erholte sich der Stamm von der Wirkung des Antibiotikums. Dies stimmt mit ähnlichen Untersuchungen von Herrlich und Schweiger überein, die erst nach ca. 3o Minuten eine Wirkung von Nitrofurantoin feststellen konnten (6). Nach zwei bis drei Stunden erholten sich die Kulturen von der Hemmung. Das läßt vermuten, daß das NF von den Bakterien zu einer inaktiven Verbindung abgebaut werden kann.

Für die stationäre Kultur mußte die doppelte Konzentration verwendet werden, um eine Wirkung zu erkennen. Exponentiell wachsende Kulturen reagierten auf wesentlich niedrigere NF-Konzentrationen. Das ist dadurch zu erklären, daß für die Zellteilung eine Fülle von Enzymsystemen notwendig ist, von denen die Gruppe der induzierbaren Enzyme gehemmt wird (6).

4.4 Prüfen der Nitrofurantoin-sensiblen Mutanten auf Strahlensensibilität

Mit dem Versuch sollte überprüft werden, ob NF-sensible Mutanten auch strahlensensibel sind. Frühere Untersuchungen haben ergeben, daß strahlensensible Mutanten auch NF-empfindlich waren (eigene Versuche, 9). Es ist zu erwarten, daß NF-sensible Bakterien auch strahlenempfindlich sind.

Die Mehrzahl, und zwar 74 % der isolierten NF-sensiblen Mutanten erwies sich als UV-sensibel, was wiederum auf eine Korrelation der NF- und UV-Sensibilität hinweist.

Da die Versuche öfters wiederholt wurden, mußten mehrmals neue Kulturen angelegt werden. Die Bakterien waren mit dem Mutagen Nitrosoguanidin behandelt worden. Dies führt aber oft nicht zu der sogenannten "one-step" Mutation, wie hier die erwünschte NF-Sensibilität, sondern verursacht Mutationen an verschiedenen Genorten. Es kann nach mehreren Generationen passieren, daß sich auch Rückmutanten bilden, das heißt, daß die Mutanten mit einer bestimmten Eigenschaft durch eine weitere Mutation diese Eigenschaft wieder verlieren.

Bei den Versuchen passierte es mehrmals, daß ursprünglich NF-sensible Mutanten bei späteren Tests diese Eigenschaft nicht mehr hatten. Diese Rückmutanten sind wahrscheinlich die Ursache dafür, daß nicht alle der isolierten NF-sensiblen Mutanten UV-sensibel sind.

Ein wichtiges Ergebnis der Versuche ist, daß NF-sensible Mutanten nicht zwangsläufig rec-Mutanten sind, denn nur etwa die Hälfte der NF-sensiblen Mutanten waren UV- und Röntgen-sensibel wie die rec-Mutanten. Etwa 2o % sind nur UV-sensibel und daher vermutlich uvr-Mutanten. Daher kann die Selektion nach NF-sensiblen Mutanten zur Isolierung von rec-Mutanten nicht benützt werden, wie von Jenkins und Bennet vorgeschlagen wurde (9). Diese Methode eignet sich jedoch zur Anreicherung von rec-Mutanten aus einem Populationsgemisch und erleichtert damit ihre Isolierung.

ZUSAMMENFASSUNG

Uvr- und rec-Mutanten von E. coli K-12 wurden auf Strahlen- und Nitrofurantoin-Sensibilität getestet. Die Versuche ergaben, daß alle getesteten Mutanten strahlensensibler und NF-sensibler waren als der Wildtyp AB 1157. Ein Vergleich der NF-Sensibilität mit der UV- und Röntgen-Sensibilität zeigte, daß die NF-Sensibilität mit der UV-Sensibilität korreliert ist.

Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der NF-Wirkung auf E. coli ergab, daß die Wirkung des NF nach ca. 1 1/2 - 2 Stunden nachließ. Dies kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß es den E. coli Bakterien gelingt, das NF zu einer inaktiven Form abzubauen.

Mit Nitrosoguanidin wurden Mutanten von E. coli AB 1157 induziert und mit der Replika-Plating-Methode NF-sensible Mutanten aus dem Populationsgemisch isoliert. Unter den so isolierten Mutanten waren 74 % UV-sensibler als der Wildtyp und 55 % Röntgenstrahlen-sensibler. NF-sensible Mutanten sind damit nicht zwangsläufig als rec-Mutanten zu betrachten, sondern es befinden sich in dem Populationsgemisch auch uvr-Mutanten.

Literatur:

1. Beukers, R., and W. Berends (196o):
Isolation and identification of the irradiation product of thymine.
Biochim. Biophys. Acta, 41, 551-441.

2. Beukers, R., and W. Berends (1961):
The effect of UV irradiation on nucleic acids and their components.
Biochim. Biophys. Acta, 49, 181-189.

3. Boyce, R. P., and P. Howard-Flanders (1964):
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers form DNA in E. coli K-12.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 51, 293-3oo.

4. Defais, M., P. Fauquet, M. Radman, and M. Errera (1971):
Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetic systems.
Virology, 43, 495-5o3.

5. Dood, M. C., and W. B. Stillmann (1944):
The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 82, 11-18.

6. Herrlich, P., and M. Schweiger (1976):
Nitrofurans, a group of synthetic antibiotics, with a new mode of action: discrimination of specific messenger RNA classes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73, 3386-339o.

7. Hill, R. F., and E. Simson (1961):
A study of radiosensitive and radioresistant mutants of Escherichia coli strain B.
J. Gen. Microbiol., 24, 1-14.

8. Inouye, M., and A. B. Pardee (197o):
Changes of membrane proteins and their relation to DNA synthesis and cell division of E. coli.
J. Biol. Chem., 245, 5813-5819.

9. Jenkins, S. T., and P. M. Bennet (1976):
Effect of mutations in DNA repair pathways on the sensitivity of Escherichia coli K-12 strains to nitrofurantoin.
J. Bacteriol., 125, 1214-1216.

1o. Kelner, A. (1949):
Photoreactivation of ultraviolet-irradiated Escherichia coli with special reference to dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation.
J. Bacteriol., 58, 511-522.

11. Lederberg, I., and E. M. Lederberg (1952):
Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
J. Bacteriol., 63, 399-4o6.

12. McCalla, D. R. (1964):
Effect of some nitrofurans on DNA synthesis and prophage induction.
Can. J. Biochem., 42, 1245-1247.

13. McCalla, D.R. (1965):
Nitrofuran derivatives as radiomimetic agent: cross resistance studies with Escherichia coli.
Can. J. Microbiol., 11, 185 - 191.

14. McCalla, D. R., A. Reuvers, and C. Kaiser (197o):
Mode of action of nitrofurazone.
J. Bacteriol., 1o4, 1126-1134.

15. McCalla, D. R., A Reuvers, and C. Kaiser (1971):
Breakage of bacterial DNA by nitrofuran derivatives.
Cancer Research, 31, 2184 - 2188.

16. Payne, J. I., P. E. Hartman , S. Mudd, and H. W. Phillips (1956):
Cytological analysis of ultraviolet-irradiated Escherichia coli. III Reactions of a sensitive strain and its resistant mutants.
J. Bacteriol., 72, 461-472.

17. Radman, M., and R. Devoret (1971):
UV-reactivation of bacteriophage λ in excision repair-deficient hosts independance of red functions and attached regions.
Virology, 43, 5o4-5o6.

18. Regan, J. D., and R. B. Setlow (1974):
Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens.
Cancer Res., 34, 3318-3325.

19. Rupp, W.D ., and P. Howard-Flanders (1968):
Discontinuities in the DNA synthetisized in an excision-defective strain of Escherichia coli.
J. Mol. Biol., 61, 25-44.

2o. Sedgwick, S. G. (1975):
Inducible error-prone repair in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2753-2757.

21. Sedgwick, S. G. (1975):
Genetic and kinetic evidence for different types of postreplication repair in Escherichia coli B.
J. Bacteriol., 123, 154-161.

22. Setlow, R. B., and W. L. Carrier (1964):
The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 51, 226-231.

23. Setlow, R., and J. K. Setlow (1972):
Effects of radiation on polynucleotides.
Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1, 293-346.

24. Weigle, J. J. (1953):
Induction of mutation in a bacterial virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 39, 628-636.

25. Witkin, E. M. (1976):
Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli.
Bacteriol. Rev., 4o, 869-9o7.

26. Woody-Karrer, P., and J. Greenberg (1963):
Resistance and cross resistance of Escherichia coli S mutants to the radiomimetic agent nitrofurazone.
J. Bacteriol., 85, 12o8-1216.

LEBENSLAUF

Am 17.1o.1951 wurde ich in Marktoberdorf Kreis Ostallgäu geboren.

Von 1957 - 1962 besuchte ich die Volksschule Leuterschach. Danach wechselte ich in das mathem. nat. Gymnasium Marktoberdorf über, das ich im Jahre 1972 mit der Reifeprüfung beendete.

Die Zulassung zum Zahnmedizin-Studium erhielt ich zum Sommersemester 1973 für die LMU München. Dort legte ich 1974 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1975 die zahnärztliche Vorprüfung mit Erfolg ab. Nach dem Staatsexamen, dessen letzte Prüfung am 24.7.1978 war, erhielt ich am 8.8.1978 die Approbation als Zahnarzt.

Seit Anfang 1979 bin ich als Ausbildungsassistent in einer Zahnarztpraxis tätig.

Marktoberdorf, den 2o.11.198o